#GLP0002(プライマーミックス)
#GLT0002(テストストリップ)

人と科学のステキな未来へ
コスモ・バイオ株式会社

2013 年 3 月作成(第 1 版)

[研究用試薬]

GeneLine ベロ毒素 プライマーミックス／テストストリップ

GeneLine VT　Primer mix / Test strip

≪取扱説明書≫

※本キットをご使用になる前に必ずお読みください。

【開発の経緯】

大規模な食中毒や死亡例が報告されている腸管出血性大腸菌は、これらが産生するベロ毒素(Verotoxin, VT)により症状を示します。このベロ毒素は抗原性の異なるベロ毒素 1 型(VT1)とベロ毒素 2 型(VT2)に大別され、非常に強力な毒性を有することが知られています。

腸管出血性大腸菌は、O26、O111、O157 をはじめとして多数の血清型が検出されており[1]、すべての腸管出血性大腸菌による食中毒を防止するためには、食品中のベロ毒素の確認が最も有効です。そのため、平成 24 年 12 月 17 日付け食安監発 1217 第 3 号厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知「腸管出血性大腸菌 O26、O111、及び O157 の検査法について」(以下、通知法)[2]では、ベロ毒素遺伝子検出によるスクリーニングを行い、陽性であった場合には分離培養法で菌の分離を行い、ベロ毒素の存在を確認することにより結果を判定することとなっています。

本品は、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法と簡易・迅速な核酸検出法である核酸クロマトグラフィーを組み合わせた、腸管出血性大腸菌が有するベロ毒素遺伝子を検出するための研究用試薬で、*VT1* 遺伝子および *VT2* 遺伝子の検出と識別が可能です。

【本品の特徴】

1)　培養後の増菌液から約 2 時間で結果が得られます。
2)　*VT1* および *VT2* プライマーが含まれているため、両遺伝子を一回の反応で増幅することが可能です。
3)　アガロース電気泳動に比べ、操作ならびに結果判定が容易なうえ、特異性の高い結果を得ることができます。

【キットの内容】

1)　構成品

プライマーミックス (冷凍試薬)
A:　10×PCR プライマーミックス･･･100µL×1 本
B:　*VT1* 陽性コントロール･･･････　10µL×1 本
C:　*VT2* 陽性コントロール･･･････　10µL×1 本
F:　取扱説明書･･･････････････････　1 部

テストストリップ (冷蔵試薬)
D:　テストストリップ･･･････････････ 4 テスト×12 包装
E:　展開用バッファー･････････････1.4mL×2 本
F:　取扱説明書･･･････････････････　1 部
G:　ビニールパウチ袋 ･･･････････　1 枚

注1:　**プライマーミックスとテストストリップは別売りです。**
また、PCR 用酵素、および DNA 抽出試薬は別途ご準備ください。

2)　成分

プライマーミックス
①　10×PCR プライマーミックス
VT1、*VT2* 増幅プライマー
②　*VT1* 陽性コントロール
VT1 産生大腸菌由来 DNA
③　*VT2*陽性コントロール
VT2産生大腸菌由来 DNA

テストストリップ
①　試薬含有部
ラテックス標識 *VT1*、*VT2* 検出プローブ
②　展開部
VT1 検出プローブ、*VT2* 検出プローブ、
コントロールライン用プローブ

【目的】

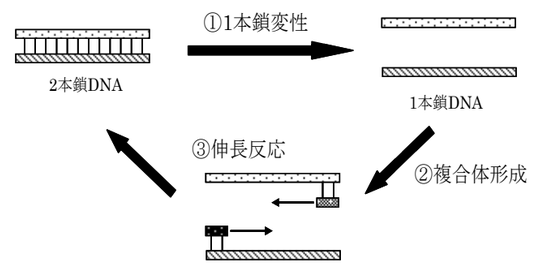
1)　食品中に含まれる腸管出血性大腸菌が有するベロ毒素遺伝子の検出。

【検出原理】

1)　PCR 法

PCR 法は、DNA 合成酵素(DNA ポリメラーゼ)およびプライマーを用いて増幅対象の DNA を増幅する手法です。①高温で 2 本鎖 DNA を 1 本鎖に変性させ(1 本鎖変性)、②プライマーを増幅対象 DNA の一部に結合させ(複合体形成)、③DNA ポリメラーゼがプライマーを起点として相補的な DNA を伸長させる(伸張反応)、という 3 つのサイクルを繰り返すことによって、増幅対象の DNA を指数関数的に増幅します。

本キットではプライマーミックスに含まれる *VT1* および *VT2* プライマーによりベロ毒素遺伝子を増幅します。



【使用上または取り扱い上の注意事項】

1)　使用上の注意事項

①　本キットをご使用になる際には、取扱説明書をよく読み、記載された試験方法に従って使用してください。
②　本キットは研究用試薬であり、臨床的診断を下す目的で使用することはできません。
③　各試薬は保存温度を厳守してください。また保存にあたっては、コンタミネーション防止に注意してください。
④　本キットはベロ毒素 1 型、ベロ毒素 2 型をコードする *VT1*、*VT2* 遺伝子を検出対象としているため、*VT* 遺伝子を持たない大腸菌は陰性となります。
⑤　本キットにより得られた結果の判断および利用は、お客様の責任のもと実施してください。また、その結果生じた損害および損失については、当社は責任を負うことはできません。
⑥　試験溶液の調製に使用する器具ならびに試薬類(培地を含む)の使用方法等については、それぞれの製造元もしくは販売元にご確認ください。
⑦　本取扱説明書は検査担当者のガイドラインとして作成されています。各操作手順や各々の食品におけるアプリケーションの妥当性については自ら検証してください。
⑧　商品の仕様については、予告なく変更になる場合があります。

2)　危険防止上の注意事項

①　本キットの検出対象である腸管出血性大腸菌、またはそれ以外の微生物による感染の可能性もあるため、試験を実施する際には保護手袋、保護メガネ等を着用するなど十分留意してください。
②　試験実施の際には、適切な設備・施設、責任ある管理者の指導のもとで標準的な微生物検査手順にて実施してください。
③　誤って試験溶液等が目や口に入った場合には、水道水で洗い流す等の応急処置を行い、医師の手当てを受けてください。

3)　廃棄上の注意事項

①　増菌後の培養液、試料および DNA 抽出液の残りなどは、感染の可能性があると考え、必ずオートクレーブ処理(121℃、20 分) などの適切な滅菌処理を施してください。
②　本キットならびに試料および試験溶液の残りなどを廃棄する場合には、当該地域の廃棄物に関する規定に従い、衛生面、環境面に十分配慮し廃棄してください。

【貯法・使用期限】

1)　貯法　　:　プライマーミックス　　:冷凍 (−20℃) にて保存してください。また、凍結融解は出来る限り避けてください。
テストストリップ:冷蔵(2～8℃)、遮光にて保存してください。また、凍結は避けてください。

2)　使用期限 :　製造日より 6 ヶ月 (使用期限は容器ラベル及び外箱に表示)

注1:　**プライマーミックスの使用期限は冷凍保存時のものです。解凍後の使用期限は設定しておりませんので、お客様の責任のもとご使用ください。**

【包装単位】

製品名	構成品	容量
GeneLine ベロ毒素 プライマーミックス	A:10×PCR プライマーミックス	100µL×1 本
	B:*VT1* 陽性コントロール	10µL
	C:*VT2* 陽性コントロール	10µL
	F:取扱説明書	1 部
GeneLine ベロ毒素 テストストリップ	D:テストストリップ	4 テスト×12 包装
	E:展開用バッファー	1.4mL×2 本
	F:取扱説明書	1 部
	G:ビニールパウチ袋	1 枚

【参考文献】

1)　甲斐明美ら:臨床と微生物, 23, 827-834(1996).
2)　厚生労働省「腸管出血性大腸菌 O26、O111 及び O157 の検査法について」(平成 24 年 12 月 17 日食安監発 1217 第 3 号)

〔販売元および問い合わせ先〕

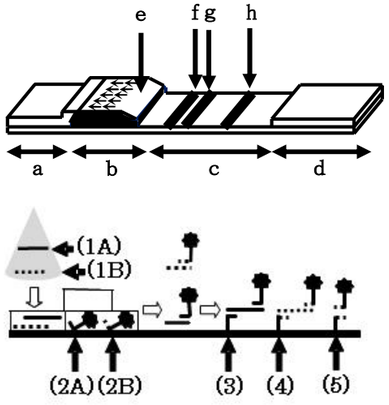
キット外装ラベルに記載

〔製造元〕

〒300-2646　茨城県つくば市緑ヶ原 3-3
日本ハム株式会社　中央研究所
電話:029(847)7825／FAX:029(848)1256
URL:http://www.rdc.nipponham.co.jp

2) 核酸クロマトグラフィー

テストストリップの試料滴下部(a)に展開用バッファーと混合したPCR反応液(試験溶液)を含浸させると、試薬含有部(b)に含まれるラテックス標識プローブ(2A、2B)が溶解し、試験溶液中の腸管出血性大腸菌由来増幅ベロ毒素遺伝子(*VT1*:1A、*VT2*:1B)と複合体を形成します。形成された複合体は展開部(c)を毛細管現象により移動し、*VT1* テストライン出現位置(f)に固定化された *VT1* 検出プローブ(3)、*VT2*テストライン出現位置(g)に固定化された *VT2*検出プローブ(4) に捕捉され、ラテックスによる青黒色のラインが出現します。本キットはこの青黒色のラインを目視により確認し、試験溶液中の腸管出血性大腸菌中のベロ毒素遺伝子の有無を判定します。また、余剰のラテックス標識プローブ(2B)は展開部(c)を移動し、コントロールライン用プローブ(5)に捕捉され、コントロールライン出現位置(h)に青黒色のラインを形成します。このラインの有無により、核酸クロマトグラフィーが正常に実施されたことを確認します。



【鋳型 DNA の調製】

1) 必要な機器・器材

ストマッカー袋(フィルター付を推奨)、ストマッカー、インキュベーター、オートクレーブ、増菌用培地、サーマルサイクラー、PCR用 0.2mL チューブ、他

2) 試料の調製

① 被検食品から 200g(または 200mL)以上を採取してください。
② 固体の場合には、多くの部位から少しずつ採取した 25g、液体の場合にはよく混合した 25mL を試料としてください。

3) 増菌培養

① 通知法[2]に従い、試料に対し 9 倍量の mEC 培地を加え、適切な時間ストマッキングした後、42±1℃で 22±2 時間培養を行ってください。

4) DNA 抽出操作

① 培養終了後、ストマッカー袋をインキュベーターより取り出し、培養液の飛散に注意しながら、緩やかに撹拌してください。
② 滅菌済みピペットを用いて培養液を分注し、通知法に従い DNA 抽出を行い、抽出液を鋳型 DNA としてください。

注1: 培養液の残りは、試験実施後の確認試験に使用する可能性があるため、試験終了まで滅菌せず安全に注意して保存してください。
注 2: DNA 抽出試薬は通知法[2]に従い、別途ご準備ください。

【試験操作】

1) PCR (GeneLine ベロ毒素 プライマーミックスを使用します。)

① 別途購入したPCR酵素製品の取扱説明書に従い調製したPCR酵素溶液(PCR酵素製品に添付されているバッファーや酵素などの混合液;添加量は各製品の取扱説明書に従ってください)と、本キット添付のプライマーミックス 1テスト当たり 2μL、および抽出した鋳型 DNA 1テスト当たり 1μL を混合し、さらに滅菌蒸留水を加えて、1 テスト当たり 20μL になるように調製したものを PCR 反応液としてください。

注1: PCR 酵素製品により本キットの性能に影響が生じることが確認されています。下記の PCR 酵素製品については性能に影響がないことを確認済みです。
・THUNDER *Taq* Gold DNA Polymerase LD (株式会社ニッポンジーン製, 製品コード:314-07091)
・Blend Taq® -Plus- (東洋紡株式会社製, 製品コード:BTQ-201)
・*EX Taq*® HotStart Version (タカラ株式会社製, 製品コード:RR006A)

② サーマルサイクラーを用いて、下記の設定にて DNA を増幅してください。

95℃、5分 ➡ [95℃、30秒 / 60℃、20秒 / 72℃、30秒] ×45サイクル ➡ 94℃、5分 ➡ 4℃静置

注 2: 上記設定の網掛けで記載した条件については、必ずお使いの PCR 酵素製品の取扱説明書に記載された条件に従ってください。。
注 3: 解凍したプライマーミックスは氷上で取り扱ってください。また、混合した PCR 反応液は反応直前まで氷上に置いてください。
注 4: PCR 反応の陰性コントロールとして、鋳型 DNA の代わりに滅菌蒸留水 1μL を加えたものを一本用意してください。また、陽性コントロールとして、鋳型 DNA の代わりにキット添付の *VT1* 陽性コントロール、*VT2* 陽性コントロール各 1μL を加えたものを一本ずつ、もしくは *VT1* 陽性コントロールと *VT2* 陽性コントロールを等量混合したものを 1μL 加えたものを一本用意してください。
注 5: PCR 反応液に鋳型 DNA の代わりにコロニーを懸濁することでコロニーから直接 PCR を行うことができます。コロニーの懸濁には、滅菌したチップ等を使用し、多量の菌体を持ち込まないようご注意ください。(多量の菌体は PCR 反応を阻害する恐れがあります。)

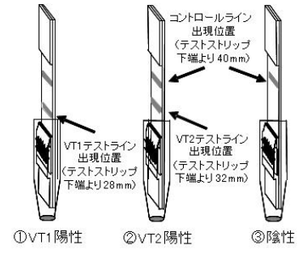
2) 核酸クロマトグラフィーによる検出 (GeneLine ベロ毒素 テストストリップを使用します。)

① 展開用バッファー、テストストリップを室温に戻してください。
② サーマルサイクラーより取り出した PCR 後のチューブに、展開用バッファー50μL を添加したものを試験溶液としてください。
③ 試験溶液調製後、直ちに (3～5 分以内をメドとしてください) テストストリップをチューブに挿入し、テストストリップをチューブ内で上下させて、試験溶液を軽く撹拌してください。
④ テストストリップをチューブ内に静置し、15 分後に目視で判定してください。

注1: テストストリップは吸湿の影響により、正しい結果が得られないことがあるため、室温に戻してからアルミ包装から取り出してください。また、使用しないテストストリップは乾燥剤とともに添付のビニールパウチ袋に入れ冷蔵保存してできる限り早くご使用ください。
注2: テストストリップの試料滴下部および展開部には、直接手などで触れたり、キズをつけないよう注意してください。テストストリップを持つ場合には、吸収パッド(検出原理(2)核酸クロマトグラフィー図内(d))を持つようにしてください。
注3: テストストリップの下端がチューブの壁にあたるように静置してください。

3) 結果の判定

① 試験開始15分後に *VT1*テストライン出現位置およびコントロールライン出現位置に青黒色のラインが観察される場合には、*VT1* 陽性と判定してください。
② 試験開始15分後に *VT2*テストライン出現位置およびコントロールライン出現位置に青黒色のラインが観察される場合には、*VT2* 陽性と判定してください。
③ テストライン出現位置に青黒色のラインが認められず、コントロールライン出現位置にのみ青黒色のラインが観察される場合には、陰性と判定してください。
④ コントロールライン出現位置に青黒色のラインが認められない場合には、核酸クロマトグラフィーによる検出から再試験を行ってください。試験溶液の展開に異常があった可能性があります。



注1: PCR により DNA が正常に増幅されたことを確認するため、*VT1* 陽性コントロールが *VT1* 陽性(右図①)、*VT2* 陽性コントロールが *VT2* 陽性(右図②)、陰性コントロールが *VT1*、*VT2* ともに陰性(右図③)であることを確認してください。
注2: 本キットで陽性と判定された試料については、通知法などその他の方法にて必ず確認試験を実施してください。なお、本キットの試験に用いた増菌培養済み試料を通知法などの確認試験に使用することが可能です。

【性能】

1) 検出限界

Escherichia coli O26 IID3005 (*VT1* 陽性)、 *Escherichia coli* O157 RIMD05091061 (*VT2* 陽性) 由来の DNA 抽出液を用いて、本取扱説明書に記載された「試験操作」に従い試験を行うとき、抽出 DNA 濃度が 10 pg/μL 以上のとき、陽性を示します。

注1: 本キットの検出限界は、腸管出血性大腸菌の菌株により異なります。
注2: ご使用になる DNA 抽出試薬、PCR 酵素製品によって検出感度が異なることがあります。
注3: 培養後の菌数が極めて少ない場合には、腸管出血性大腸菌由来の DNA が増幅されず偽陰性を示す可能性があります。
注4: 抽出後の DNA が極めて多い場合には、腸管出血性大腸菌由来の DNA が増幅されず偽陰性を示す可能性があります。

2) 交差反応性

① 以下の菌株由来 DNA 抽出液を用いた交差試験において、交差反応性は認められませんでした。

菌種	菌株	15分判定	
		VT1	*VT2*
Escherichia coli (*VT*非産生)	ATCC 43888, 700728, 25922, 11775	－	－
Escherichia hermanii	JCM 1473	－	－
Citrobacter freundii	ATCC 8090	－	－
Enterobacter aerogenes	ATCC 13048	－	－
Enterobacter cloacae	ATCC 13047, 49141	－	－
Enterobacter sakazakii	ATCC 51329	－	－
Klebsiella oxytoca	ATCC 8724	－	－
Serratia liquefaciens	ATCC 27592	－	－
Serratia marcescens	ATCC 8100	－	－
Serratia odorifera	ATCC 33077	－	－
Proteus vulgaris	ATCC 6380	－	－
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 9027	－	－